

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-285815

(43)公開日 平成8年(1996)11月1日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	27/416		G 0 1 N 27/46	3 0 1 Z
	27/28	3 3 1	27/28	3 3 1 Z
	27/327		27/30	3 5 3 A
				3 5 3 R
			27/46	3 3 6 Z
審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 5 頁)				

(21)出願番号 特願平7-115270

(22)出願日 平成7年(1995)4月18日

(71)出願人 000001443

カシオ計算機株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目6番1号

(72)発明者 当山 忠久

東京都八王子市石川町2951番地の5 カシ  
オ計算機株式会社八王子研究所内

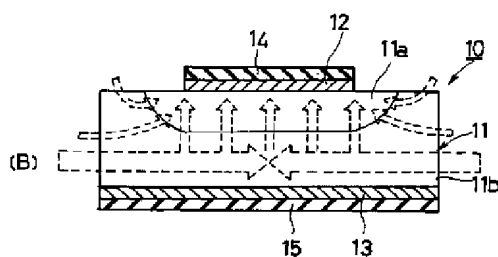
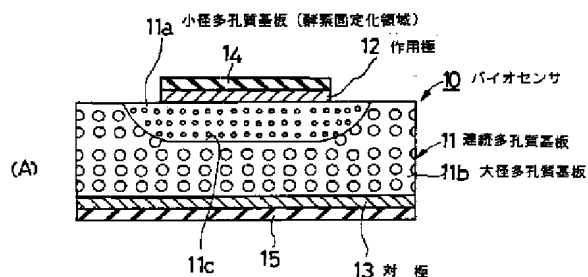
(74)代理人 弁理士 杉村 次郎

(54)【発明の名称】 バイオセンサ

(57)【要約】

【目的】 迅速且つ安定した測定が行えるバイオセンサを提供する。

【構成】 連続多孔質基板11の表面に作用極12が形成され、裏面に対極13が形成されると共に、連続多孔質基板11が孔径0.2 $\mu$ m程度の小径多孔質基板11aと、孔径100 $\mu$ m程度の大径多孔質基板11bとを接合して形成されている。小径多孔質基板11a内には、酵素が固定化され、大径多孔質基板11b内には酵素を固定化しない構成とする。このような構成とすることにより、被検査液が大径多孔質基板11b内に速やかに浸入し、小径多孔質基板11aの周囲から被検査液が均一に浸入するため、迅速で安定した基質濃度の測定が可能となる。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 連続多孔質基板の表裏面にそれぞれ電極が形成されると共に、前記連続多孔質基板内に、酵素、あるいは酵素とメディエータとが固定化された酵素固定化領域が形成されたバイオセンサにおいて、前記連続多孔質基板の前記酵素固定化領域は、一方の電極近傍に形成され、該酵素固定化領域以外の前記連続多孔質基板中の孔の径の平均の寸法が、該酵素固定化領域中の孔の径の平均の寸法より大きいことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 2】 前記連続多孔質基板は、前記酵素固定化領域を構成する小径多孔質基板と、それ以外の部分を構成する大径多孔質基板とが接合されてなることを特徴とする請求項 1 記載のバイオセンサ。

【請求項 3】 前記連続多孔質基板の孔の径の平均の寸法は前記連続多孔質基板の一方の電極面側から他方の電極面側に向けて漸次大きくなることを特徴とする請求項 1 記載のバイオセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、バイオセンサに関し、さらに詳しくは、各種液体の成分濃度を、固定化した酵素などを利用して検出する、臨床検査や水質検査などに用いられる酵素センサに係る。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、この種のバイオセンサとしては、図 5 に示すようなものが知られている。このバイオセンサは、連続多孔質基板 1 の表面に作用極 2 が、裏面に対極 3 が形成され、作用極 2 と対極 3 の表面にはそれぞれ絶縁膜 4、5 が形成されている。そして、この連続多孔質基板 1 には、例えばグルコースの酸化酵素であるグルコースオキシダーゼが全体にわたって分布するように固定化されている。なお、連続多孔質基板 1 内に形成されている孔の径寸法は、0.1 または 0.2  $\mu\text{m}$  程度の均一なものであり、連続多孔質基板 1 の露出表面より被検査液が、作用極 2 と対極 3 との間に浸入し得るようになっている。

【0003】 このような構成のバイオセンサを用いて被検査液中のグルコース濃度を測定するには、まず、作用極 2 と対極 3 との間に所定の電圧を印加し、同時に両極間を流れる電流の検出を可能な状態とする。そして、被検査液中にセンサを浸し、被検査液を作用極 2 と対極 3 との間に浸透させる。このとき、グルコースが酵素の酸化触媒作用により酸化され、酸素が消費されるとともに過酸化水素が発生する。この酸素消費量、または過酸化水素発生量は、グルコース濃度と相関があり、これを測定することでグルコース濃度を測定することが可能となる。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上記し

2

た従来のバイオセンサにあっては、連続多孔質基板 1 全体に酵素が固定化されている構成であるため、酵素自体が物理的に障害物となり、被検査液が連続多孔質基板内に浸入するまでに時間を要するという問題があった。特に、連続多孔質基板の作用極及び対極の重なり部分は、これらの電極自体も物理的な障害物になるので、特に被検査液が浸入しにくく、このため、測定の初期の状態では、電極間に対応する連続多孔質に被検査液の濃度が電極間の位置によって大幅に異なり、位置によって酵素反応を起こす時間的にズレが生じ、被検査液の濃度に応じた電極間に流れる電流が定常状態になるのに時間がかかるという問題点があった。また、連続多孔質基板内の酵素の数を減らすと迅速かつ高精度に測定することができなかった。

【0005】 この発明が解決しようとする課題は、基質濃度を迅速かつ高精度に測定できるバイオセンサを得るにはどのような手段を講じればよいかという点にある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 請求項 1 記載の発明は、連続多孔質基板の表裏面にそれぞれ電極が形成されると共に、前記連続多孔質基板内に、酵素、あるいは酵素とメディエータとが固定化された酵素固定化領域が形成されたバイオセンサにおいて、前記連続多孔質基板の前記酵素固定化領域は一方の電極近傍に形成され、該酵素固定化領域以外の前記連続多孔質基板中の孔の径の平均の寸法が、該酵素固定化領域中の孔の径の平均の寸法より大きいことを、この解決手段としている。また、請求項 2 記載の発明は、前記連続多孔質基板が、前記酵素固定化領域を構成する小径多孔質基板と、それ以外の部分を構成する大径多孔質基板とが接合されてなることを特徴としている。

【0007】 請求項 3 記載の発明では、連続多孔質基板の孔の径の平均の寸法は、連続多孔質基板の一方の電極面側から他方の電極面側に向けて漸次大きくなることを特徴としている。

## 【0008】

【作用】 請求項 1 記載の発明においては、酵素固定化領域以外の連続多孔質基板中の孔の径寸法が大きいので、被検査液が酵素固定化領域の周囲全面に速やかに浸入されることが可能となる。このため、酵素固定化領域内には被検査液が領域周囲からほぼ同時に浸入し、被検査液中の基質は酵素の触媒作用を受けて酵素反応を起こす。被検査液は酵素固定化領域内に均一に浸入するため、酵素固定化領域内では酵素反応が迅速かつ均一に起こり始め、一方の電極に流れる電流は速やかに定常状態となる。これにより、電極間に基質濃度に応じて流れる電流を測定することで基質濃度を安定して検出することが可能となる。また、請求項 2 記載の発明においては、連続多孔質基板を、酵素固定化領域を構成する小径多孔質基板と、それ以外の部分を構成する大径多孔質基板とが接

合されてなる構成であるため、酵素固定化領域の形状の小径多孔質基板と、大径多孔質基板とを別々に用意すればよく孔径の設定が容易となる。

【0009】請求項3記載の発明においては、連続多孔質基板を構成する大径多孔質基板の表面から電極に平行をなす方向に被検査液が浸入し、一方の電極近傍に形成された酵素固定化領域の周囲を被検査液が速やかに覆い、酵素固定化領域内に被検査液が均一に浸入する。このため、酵素固定化領域内では酵素反応が迅速かつ均一に起こり始め、一方の電極に流れる電流は速やかに定常状態となる。ことにより、電極間に基質濃度に応じて流れる電流を初期状態より安定して測定することができ、基質濃度を迅速に検出することが可能となる。

【0010】

【実施例】以下、この発明に係るバイオセンサの詳細を図面に示す各実施例に基づいて説明する。

(実施例1) 図1(A)および(B)は、この発明に係るバイオセンサの実施例1を示している。図中10はバイオセンサであって、連続多孔質基板11の一侧表面に一方の電極としての作用極12が形成され、連続多孔質基板11の一侧表面に対向する表面に他方の電極としての対極13が形成されて大略構成されている。また、作用極12の表面には絶縁膜14が形成され、対極13の表面には絶縁膜15が形成されている。

【0011】連続多孔質基板11は、孔の径がほぼ均一で、孔の径の平均の寸法が例えば0.2μm程度の小径多孔質基板11aと、孔の径がほぼ均一で孔の径の平均寸法が例えば100μm程度の径多孔質基板11bと、が接合されて構成されている。なお、これら基板11a、11bは、例えばポリテトラフルオロエチレンなどのフッ素樹脂を連続多孔質構造にしたもので形成されている。小径多孔質基板11aは、円盤形状で上縁から下縁に向けて周囲が略テーパ面となっており、側面形状が皿形状となっている。一方、大径多孔質基板11bは、小径多孔質基板11aより径寸法の大きな円盤形状であり、その上面中央に小径多孔質基板11aを嵌合する凹部11cが形成されている。そして、大径多孔質基板11bと小径多孔質基板11aとは、凹部11cに小径多孔質基板11aが嵌合した状態で接合されている。しかも、本実施例では、小径多孔質基板11a全体にグルコース酸化酵素であるグルコースオキシダーゼが例えば架橋法や包括法などにより固定化されている。このため、小径多孔質基板11a全体が酵素固定化領域となっている。なお、図示しないが作用極12と対極13には配線を介して電圧印加回路と電流測定回路とが接続されている。

【0012】本実施例のバイオセンサ10を用いて被検査液中の基質であるグルコースの濃度を測定するには、バイオセンサ10を被検査液に浸け、作用極12と対極13とに所定の電圧を印加すると共に、両極間を流れる

電流を測定することにより、グルコース濃度が測定できる。

【0013】本実施例のバイオセンサ10においては、図1(B)に示すように、被検査液が破線で示す経路で浸入して小径多孔質基板11aに到達する。すなわち、バイオセンサ10が被検査液に浸けられると、小径多孔質基板11aより大径多孔質基板11bの孔の径寸法の方が大きいため、被検査液は大径多孔質基板11bの露出表面から対極13と平行な方向に速やかに浸透する。したがって小径多孔質基板11aの界面全面から速やかに浸透されるので効率良く測定することができる。なお、小径多孔質基板11aの露出表面からも被検査液は浸透するが、大径多孔質基板11b中を浸透する速度の方が大幅に速いため、露出していない部分の小径多孔質基板11aの周囲にも略同時に被検査液が到達して浸透が始まる。

【0014】そして、被検査液が小径多孔質基板11a内に浸透して固定化されたグルコースオキシダーゼに接触すると、その触媒作用により被検査液中の基質(グルコース)が酸化される。その際、この基質の濃度に応じて被検査液中の酸素が消費され、これによって作用極12と対極13との間に流れる電流が減少する。したがって、この電流減少量を電流測定回路によって測定された電流値から求め、予め作成された検量線のデータと照らし合わせることで、基質濃度を確定することができる。本実施例では、小径多孔質基板11a内へ被検査液が均一に浸透し始めるため、上記電流の変化が定常状態になるのに時間が掛からず、迅速な基質濃度の測定が可能となる。

【0015】(実施例2) 図2は、この発明に係るバイオセンサの実施例2を示している。本実施例のバイオセンサ10においては、同図に示すように、連続多孔質基板11が、小径多孔質基板11aと、大径多孔質基板11bと、小径多孔質基板11aの周囲を囲む大径多孔質部11dとで構成されている。そして、小径多孔質基板11aのみに酵素(グルコースオキシダーゼ)が固定化されている。また、作用極12は、小径多孔質基板11aの表面を覆うように形成されている。なお、他の構成は、上記実施例1と同様である。

【0016】本実施例においては、連続多孔質基板11を構成する小径多孔質基板11a、大径多孔質基板11b、並びに大径多孔質部11dの加工が行い易く、組み付けることで容易に構成できるという利点がある。また、本実施例によれば、全体に酵素を固定化した大型の小径多孔質ベース板を用意し、このベース板上全面に作用極12を構成する材料膜と絶縁膜とを形成し、単位小径多孔質基板11a毎に切断することにより、小径多孔質基板11aに作用極12、絶縁膜14が形成されたものを複数作成することができ、量産し易いという利点がある。

5

【0017】（実施例3）図3は、この発明に係るバイオセンサの実施例3を示している。本実施例では、連続多孔質基板11が大径多孔質基板11bに形成した凹部11cに小径多孔質基板が埋め込まれている構成からなる点で、上記した実施例1と同様であるが、小径多孔質基板11a内の孔が作用極12に向けて漸次小径となるように形成されている。なお、酵素（本実施例ではグルコースオキシダーゼ）が固定化される領域は、小径多孔質基板11a全体、または、作用極12から小径多孔質基板11aの所定深さまで形成されている。本実施例における作用・効果は、上記実施例1と同様である。

【0018】（実施例4）図4（A）、（B）は、この発明に係るバイオセンサの実施例4を示している。本実施例のバイオセンサ10に用いられる連続多孔質基板11は、小径多孔質基板11aと、大径多孔質基板11bとを貼り合わせた構成となっている。そして、作用極12の近傍の小径多孔質基板11aの部分には、グルコースオキシダーゼが固定化された酵素固定化領域16が形成されている。なお、本実施例における他の構成は、上記実施例1と同様である。

【0019】本実施例では、図4（B）に破線で示すような経路で被検査液が酵素固定化領域16へ浸透する。すなわち、大径多孔質基板11bの露出表面より浸透した被検査液は速やかに対極13と平行をなす方向に浸入し、酵素固定化領域16に到達する。そして、被検査液は、大径多孔質基板11bと小径多孔質基板11aとの界面からほぼ均一に酵素固定化領域16内に浸入して、酵素による触媒反応を起こす。このため、本実施例においても、測定電流が速やかに定常状態となり迅速に基質濃度の測定を行うことができる。

【0020】以上、実施例1～4の説明をしたが、本発明はこれらに限定されるものではなく、構成の要旨に付随する各種の設計変更が可能である。例えば、上記各実施例では、小径多孔質基板11aに固定化する酵素をグルコースオキシダーゼとすることにより、本発明のバイオセンサをグルコース濃度測定に供されるものとしたが、この他、アルコール酸化酵素であるアルコールオキシダーゼを用いればアルコール濃度を測定するためのバイオセンサとすることができ、また、コレステロール酸化酵素であるコレステロールオキシダーゼを用いれば、コレステロール濃度を測定するためのバイオセンサとすることができる。

【0021】また、上記各実施例では、酸素の消費に伴う電流の減少を測定することにより、基質濃度を確定する構成としたが、酵素の触媒作用により生成される過酸化水素を検出して基質濃度を測定するようにしても勿論よい。

【0022】さらに、上記各実施例では、小径多孔質基板11a中に酵素のみを固定化したが、これに加えてメディエータ（例えばフェロセン誘導体など）を共存させ

6

てもよい。このようにメディエータを共存させれば、基質を酸化させて還元型に変化した酵素が元の酸化型に戻る際、メディエータが酵素から電子を奪い還元型メディエータとなる。そして、この還元型メディエータが電極反応によって電極に電子を与え、これにより元の酸化型メディエータに戻る。すなわち、酵素とメディエータとを含む小径多孔質基板11a中に基質が存在すれば、酵素とメディエータとを仲介して電子が電極に移動し、基質濃度に応じた電流が流れる。したがって、この電流を検出すれば基質濃度を測定することができる。そして、このように酵素とメディエータとを小径多孔質基板11a中に共存させて固定化すれば、被検査液中に溶存酸素が全く無いか、あるいはその量が少ないときでも、基質濃度に応じた電流が流れるため、溶存酸素濃度に依存しないバイオセンサとなる。

【0023】また、上記各実施例では、連続多孔質基板11を複数の多孔質部材を組み付けることにより構成したが、一枚の連続多孔質基板で構成し、その内部の孔の径寸法を作用極13側から放射状に実質的に漸次大きくした構成としてもよい。また、連続多孔質基板11の作用極12側の面から対極13側の面に向けて孔の径寸法を漸次大きくした構成でもよい。この場合、孔径の小さい（0.2μm程度）部分では酵素分子は固定化されるが、孔径の大きい（100μm程度）部分では孔径が酵素分子の大きさよりはるかに大きいため固定化されず酵素がほとんど存在しない状態を作り出すことができる。また、このような構成とすると、基質を含む被検査液が作用極に向かう際に、粒子や分子の大きな夾（きょう）雑物質の浸入を阻止することができ、小さな分子の基質のみが酵素固定化領域に到達するようにすることができる。

【0024】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、この発明によれば、被検査液が、連続多孔質基板の孔径の大きい部分を速やかに浸透して酵素固定化領域の周囲に均一に到達するため、迅速に基質濃度が測定できるという効果がある。また、酵素固定化領域内に被検査液中の基質が均一に拡散するため、酵素反応の時間的ズレが生じにくくなり、基質濃度の測定を効率的にする効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】（A）はこの発明の実施例1を示す断面図、（B）は実施例1の被検査液の浸入経路を示す説明図。

【図2】この発明の実施例2を示す断面図。

【図3】この発明の実施例3を示す断面図。

【図4】（A）はこの発明の実施例4を示す断面図、（B）は実施例4の被検査液の経路を示す説明図。

【図5】従来のバイオセンサを示す断面図。

【符号の説明】

10 バイオセンサ

11 連続多孔質基板

7

8

11a 小径多孔質基板

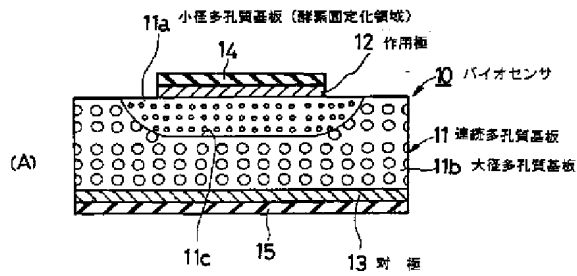
11b 大径多孔質基板

12 作用極

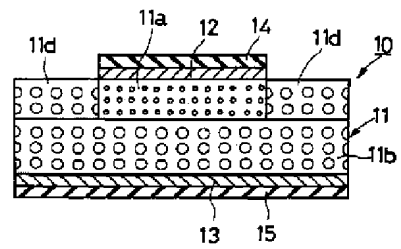
13 対極

16 酵素固定化領域

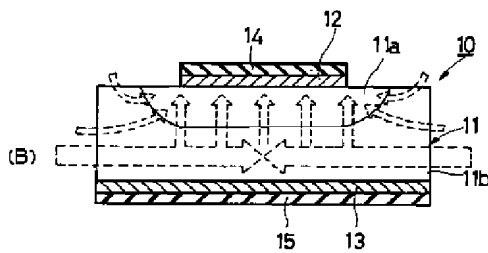
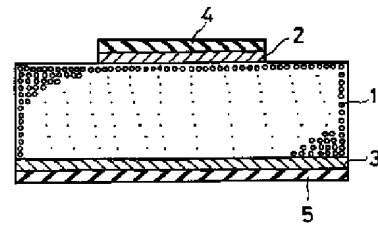
【図1】



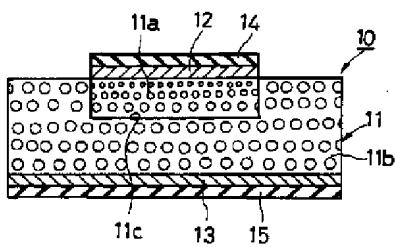
【図2】



【図5】



【図3】



【図4】

